

3



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 199 22 882 A 1**

51 Int. Cl. 7:
C 12 P 7/40
C 12 P 7/20

21 Aktenzeichen: 199 22 882.5
22 Anmeldetag: 19. 5. 1999
43 Offenlegungstag: 30. 11. 2000

DE 199 22 882 A 1

71 Anmelder:
Cognis Deutschland GmbH, 40589 Düsseldorf, DE

72 Erfinder:
Lagarden, Martin, Dr., 40764 Langenfeld, DE;
Christoph, Ralf, Dr., 40764 Langenfeld, DE; Benicke,
Wolfgang, 40723 Hilden, DE; Demirel, Adnan,
Jakarta Selatan, ID

56 Entgegenhaltungen:
DE 44 24 568 A1
DE 69 101 21 9T2
US 53 56 800 A
Pat. Abstr. of JP, JP 0010060381 AA;
Chem. Abstr. Vol. 114, No. 77745;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren und Glycerin

57 Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren und Glycerin durch enzymatische Spaltung von Triglyceriden, welches sich dadurch auszeichnet, daß man wäßrige Zubereitungen von Lipasen ("Lipasestamm-lösungen") einsetzt, die nach der Herstellung über einen Zeitraum von mindestens einer Woche bei Temperaturen im Bereich von 10 bis 80°C gelagert worden sind.

DE 199 22 882 A 1

Beschreibung

Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der oleochemischen Grundstoffe und betrifft ein enzymatisches Verfahren zur Fettspaltung.

Stand der Technik

Zur Herstellung von Fettsäuren werden pflanzliche Fette und Öle, die chemisch betrachtet Triglyceride darstellen, üblicherweise durch Einblasen von überhitztem Wasserdampf gespalten. Alternativ sind auch enzymatische Hydrolyseverfahren bekannt, die bei sehr viel milderen Bedingungen ablaufen und gelegentlich auch in der Technik eingesetzt werden, beispielsweise um im Sinne einer Vorspaltung die Säurezahl der Triglyceride zu erhöhen, die dann der konventionellen Dampfspaltung zugeleitet werden. In diesem Zusammenhang sei beispielsweise auf die Aufsätze von M. Bühler et al. in Fat. Sci. Technol. 89, 156 (1987) sowie W. Linfield in J. Am. Oil. Chem. Soc. 61, 1067 (1984) sowie die Druckschriften EP 0694073 B1, EP 0832183 B1 und WO 98127219 (Henkel Corp.) verwiesen. Von Nachteil ist jedoch, daß die bekannten Lipasen hinsichtlich ihrer Hydrolyseaktivität verbesserungswürdig erscheinen. Demzufolge hat die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin bestanden, ein Verfahren zur lipasekatalysierten Fettspaltung zur Verfügung zu stellen, daß sich durch eine erhöhte Aktivität, d. h. einen rascheren Umsatz auszeichnet.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren und Glycerin durch enzymatische Spaltung von Triglyceriden, welches sich dadurch auszeichnet, daß man wäßrige Zubereitungen von Lipasen ("Lipasestammlösungen") einsetzt, die nach der Herstellung über einen Zeitraum von mindestens einer Woche bei Temperaturen im Bereich von 10 bis 85°C gelagert worden sind.

Während man nach gängiger Lehrmeinung zur Fettspaltung bislang stets frisch hergestellte Lipasestammlösungen einsetzte, wurde nun überraschenderweise gefunden, daß durch Alterung der Zubereitungen bei höheren Temperaturen nicht etwa ein mikrobieller Abbau stattfindet, sondern ganz im Gegenteil die Hydrolyseaktivität der Enzyme beträchtlich gesteigert wird. Eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren vorgenommene Vorspaltung erlaubt somit einen erhöhten Durchsatz der Fette und Öle im konventionellen Druckspaltungsprozeß.

Triglyceride

Die Auswahl der als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren in Betracht kommenden Triglyceride ist an sich unkritisch. Neben synthetischen Triglyceriden kommen aus Gründen der Verfügbarkeit vorzugsweise pflanzliche oder tierische Fette und Öle in Betracht. Typische Beispiele sind pflanzliche Öle wie etwa Kokosöl, Palmöl, Palmkernöl, Olivenöl, Olivenkernöl, Rapsöl alter und neuer Züchtung, Sonnenblumenöl alter und neuer Züchtung, Ricinusöl, Leinöl, Baumwollsaatöl, Meadowfoamöl, Babassuöl, Reisöl, Erdnussöl sowie (see)tierische Fette wie etwa Rindertalg, Schweineschmalz oder Fischöl. Vorzugsweise werden raffinierte, d. h. entschleimte Triglyceride eingesetzt, deren Wassergehalt im Bereich von 0,01 bis 20 und insbesondere 0,1 bis 5 Gew.-% liegt. Die Triglyceride können von 0,01 bis 20 und insbesondere 0,1 bis 15 Gew.-% freie Fettsäuren enthalten und Iodzahlen im Bereich von 1 bis 180, vorzugsweise 5 bis 150 und insbesondere 45 bis 95 aufweisen.

Lipasen

Unter dem Begriff Lipasen werden Enzyme verstanden, die zur Gruppe der Hydrolasen bzw. Esterasen gehören und spezifisch Triglyceride in die Bestandteile Fettsäure und Glycerin spalten, wobei das Aktivitätsoptimum der Enzyme üblicherweise im Bereich von pH = 5 bis 9 liegt. Eine Übersicht hierzu findet sich beispielsweise in Trends Biochem. Sci. 14, 125 (1989). Geeignete Lipasen, wie beispielsweise von Candida rugosa werden von der Firma Novo Nordisk unter der Marke Lipolase® 30 T oder 100 T (Novo Nordisk) als Waschmittelenzyme angeboten. Einsetzbar sind auch handelsübliche flüssige Lipasepräparationen.

Hydrolyse

Zur Herstellung einer Stammlösung bzw. -suspension werden die Lipasen unter Rühren in Wasser eingetragen und anschließend über einen Zeitraum von mindestens 1 Woche, vorzugsweise von 1 bis 10 Wochen gelagert. Es hat sich als optimal erwiesen, die Stammlösungen 2 bis 8 Wochen zu lagern, da anschließend wieder ein allmählicher Abfall der Hydrolyseaktivität zu beobachten ist. Die Lagertemperatur sollte dabei zwischen 10 und 80°C liegen, wobei ein Bereich von 20 bis 50°C besonders vorteilhaft ist. Werden die gelagerten ("gereiften") Lipasen dann den Triglyceriden zugesetzt, so beträgt deren Einsatzkonzentration in der Regel 0,1 ppm bis 15 Gew.-% und vorzugsweise 1 ppm bis 5 Gew.-%. Die Reaktions-temperatur sollte im Bereich von 0 bis 80 und vorzugsweise 15 bis 65°C liegen. Durch ausreichende, idealerweise kontinuierliche Durchmischung des Reaktionsgemisches, z. B. bei Rührgeschwindigkeiten von 20 bis 1000 Upm, vorzugsweise 80 bis 300 Upm oder auch kontinuierliches Umpumpen wird die Hydrolysegeschwindigkeit der Reaktionspartner gesteigert, andernfalls nimmt sie deutlich ab. Der Wassergehalt des Reaktionsgemisches kann – bezogen auf die Triglyceride – bei 0,01 bis 40, vorzugsweise 1,5 bis 8 Gew.-% liegen.

Beispiele

Enzymatische Vorspaltung von Palmkernöl. Zur Herstellung einer Lipasestammlösung wurden 806,5 mg Lipolase®

100 T (Novo Nordisk) in einer 50-ml Weithalsflasche mit Magnetrührstab eingewogen, danach wurden 50 ml Wasser zugegeben und die Suspension für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung (Suspension) wurde im Wärmeschrank bei 35 bis 36°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die Lipasestammlsg. für 30 min bei Raumtemperatur stark gerührt (ca. 800 Upm). In einer 100 ml Weithalsglasflasche mit Magnetrührstab wurden 75,0 g Palmkernöl (Contoh Minyak, 4,1 Gew.-% freie Fettsäuren, 0,19 Gew.-% Wasser, IZ 18,04, Herkunft Indonesien, vorher im Wärmeschrank bei 50°C aufgeschmolzen) und 2,25 g Brauchwasser eingewogen. Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette wurden dem gerührten Ansatz genau 0,375 ml der Lipasestammlösung zudosiert. Daraus ergibt sich eine Konzentration der Lipase im Ansatz zu ca. 81 ppm und ein Wassergehalt von ca. 3,5% (bezogen auf Palmkernöl). Danach rührte man den Ansatz ca. 5 min bei ca. 800 Upm mit Hilfe eines Magnetrührers bei 30°C. Nach dieser Zeit reduzierte man die Rührergeschwindigkeit auf ca. 80 bis 90 Upm für den weiteren Verlauf der Versuchsdauer und nahm Proben für die Säurezahlbestimmung (Titration mit 0,1 m NaOH) zur Bestimmung des Reaktionsfortschritts (Hydrolyse des Fettes/Öls, erkennbar an einer Zunahme der Säurezahl). Die Reaktionstemperatur wurde mittels eines Thermostaten (Wasserbad) bei 30°C gehalten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Beispiele 1 bis 3 sind erfindungsgemäß, die Beispiele V1 und V2 dienen zum Vergleich.

Bei höherer Reaktionstemperatur (z. B. 40°C statt 30°C) nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit zu, ebenso bei stärkerem Rühren des Reaktionsgemisches (z. B. 250 statt 80 bis 90 Upm). Bei unterbrochener Rührung nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit hingegen ab und es werden für rohes Palmkernöl nach 168 h nur Säurezahlen im Bereich von 30 bis 40 erreicht. Die Säurezahl des vorgespaltene Fettes/Öls strebt bei längerer Versuchsdauer einem Grenzwert zu, der durch den Wassergehalt des Reaktionsgemisches und die Lage des Hydrolyse- bzw. (Rück-) Veresterungsgleichgewichts gegeben ist (im Falle von rohem Palmkernöl unter den angegebenen Versuchsbedingungen z. B. bis Säurezahl 93,9 nach 12 Tagen bei 30°C, entsprechend ca. 37 Gew.-% freie Fettsäuren).

Tabelle 1

Lipase-Vorspaltung von rohem Palmkernöl

Reaktionszeit [h]	V1	V2	1	2	3
	Säurezahl				
0	12,7	12,7	12,7	12,8	13,0
6	18,2	17,3	25,7	29,4	36,2
24	41,8	36,3	44,8	43,7	48,6
48	56,3	51,0	62,4	57,6	68,5
72		61,9	70,7	72,8	75,7
144		77,7	84,5	85,9	87,1
168	81,3	80,3	85,7	87,7	88,3
192			88,1		
216			90,2		
240			90,9		
264			93,9		
288			93,9		
Lipasestammlösung					
Lagerzeit	frisch	4 Tage	2 Wochen	3 Wochen	5 Wochen
Lagertemperatur	-	35 °C	35 °C	35 °C	35 °C

Patentansprüche

- Verfahren zur Herstellung von Fettsäuren und Glycerin durch enzymatische Spaltung von Triglyceriden, dadurch gekennzeichnet, daß man wäßrige Zubereitungen von Lipasen ("Lipasestammlösungen") einsetzt, die nach der Herstellung über einen Zeitraum von mindestens einer Woche bei Temperaturen im Bereich von 10 bis 80°C gelagert worden sind.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man wäßrige Zubereitungen von Lipasen einsetzt, die 1 bis 10 Wochen gelagert worden sind.
- Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Triglyceride pflanzliche und/oder tierische Fette und/oder Öle einsetzt.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Triglyceride einsetzt, die 0,01 bis 20 Gew.-% Wasser enthalten.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man Triglyceride einsetzt, die 0,01 bis 20 Gew.-% freie Fettsäuren enthalten.
- 5 6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Triglyceride einsetzt, die Iodzahlen im Bereich von 1 bis 180 aufweisen.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Lipasen in Mengen von 0,1 ppm bis 15 Gew.-% – bezogen auf die Triglyceride – einsetzt.
- 10 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die enzymatische Hydrolyse bei Temperaturen im Bereich von 0 bis 80°C durchführt.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktionsgemisch kontinuierlich durchmischt wird.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65